

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97110001

※ 申請日期： 97.3.21

※IPC 分類： C12P 7/04 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

可供製造 1,2-丙二醇之代謝工程微生物

METABOLICALLY ENGINEERED MICROORGANISM USEFUL FOR
THE PRODUCTION OF 1,2-PROPANEDIOL

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

代謝探索公司

METABOLIC EXPLORER

代表人：(中文/英文)(簽章)

高哲利斯/GONZALEZ, BENJAMIN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

法國聖布利爾市克萊蒙利馬生技園區

Biopole Clermont-Limagne, 63360 Saint-Beauzire, France

國 籍：(中文/英文)

法國/France

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 蘇凱利/SOUCAILLE, PHILIPPE

2. 佛爾克/VOELKER, FRANCOIS

3. 菲萊納/FIGGE, RAINER

國 籍：(中文/英文)

1.-2.皆為法國/FRANCE

3.為德國/GERMANY

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

專利合作條約；西元 2007 年 3 月 23 日；PCT/IB2007/001675

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種代謝工程微生物及其於製造 1,2-丙二醇的用途。

5

【先前技術】

C3 二元醇之 1,2-丙二醇或丙二醇(propylene glycol)係一種被廣泛使用的化學物質。其為不飽和聚酯樹脂、液體洗滌劑、冷卻劑、抗凍劑和飛機用除冰劑的一種成分。丙二醇自從 1993~1994 已被廣泛用於代替比丙烯衍生物更具毒性的乙烯衍生物。

10

目前係利用消耗大量水的氧化丙烯水合法藉由化學方法製造 1,2-丙二醇。可藉由兩種方法製造氧化丙烯，一種為利用氯環氧丙烷(epichlorhydrin)另一種則為利用過氧化氫。兩種途徑均利用高毒性物質。此外，過氧化氫途徑產生例如第三丁醇和 1-苯乙醇的副產物。為產生有價值的丙烯，這些副產物必需能加以利用。此化學途徑通常產生消旋 1,2-丙二醇，然而在某些應用上對兩種立體異構物 (R)1,2 -丙二醇和 (S)1,2 -丙二醇最感興趣。

15

此製造 1,2-丙二醇之化學方法的缺點更造就了另類的生物合成法。已確認藉由微生物從糖自然產生 1,2-丙二醇的兩種途徑。

20

第一種途徑為將 6-脫氧糖(例如，L-鼠李糖或 L-岩藻糖)裂解成二羥丙酮磷酸鹽和 (S)-乳醛酸，其可進一步被還

原成(S)1,2-丙二醇(Badia 等人, 1985)。此途徑在大腸桿菌內被功能化, 但是由於高成本的脫氧己糖而無法作為具有經濟效益的可行方法。

第二種途徑為經由糖酵解途徑接著藉由甲基乙二醛途徑的一般糖(例如, 葡萄糖或木糖)之代謝作用。二羥丙酮磷酸鹽被轉化成可被還原成乳醛酸或丙酮醇(acetol)的甲基乙二醛。然後此兩種化合物進行第二還原反應而產生 1,2-丙二醇。此途徑被(R)1,2-丙二醇的天然產生者如楔形梭狀芽胞桿菌(*C. sphenoides*)和熱解糖嗜熱菌(*T. thermo saccharolyticum*)所利用。楔形梭狀芽胞桿菌在磷酸鹽限制條件下以 1.58 克/升的滴度被用於製造 1,2-丙二醇(Tran Din 和 Gottschalk, 1985)。熱解糖嗜熱菌已被用於製造 1,2-丙二醇的研究(Cameron 和 Cooney, 1986; Sanchez-Rivera 等人, 1987)。其從 0.2 克/克葡萄糖獲得的最佳滴度為 9 克/升。然而, 由於缺少可用的基因工具, 因此這些生物在性能上的改善極為有限。

Cameron 等人(1998)曾利用大腸桿菌作為代謝工程的平台將糖轉化成 1,2-丙二醇。理論分析顯示視培養條件其產物的實際產量上限(顧及用於生長的質量平衡及能量產生)具有明顯的差異。在厭氧條件下, 為了再循環該還原輔因子將產生醋酸鹽作為副產物以及其最佳產量必需每莫耳葡萄糖被限制在 1 莫耳的 1,2-丙二醇(0.42 克/克)。在好氧條件下, 必需藉由利用氧作為末端電子受體的呼吸鏈確保輔因子的再循環並且其可在不產生副產物之下製造出

1,2-丙二醇。在這些條件下，其產量最高可達到 1.42 莫耳/莫耳(0.6 克/克)。顧及 1,2-丙二醇的最高滴度，Cameron 等人述及其對產物和副產物毒性的依賴性。1,2-丙二醇明顯低於 1,3-丙二醇的毒性以及大腸桿菌在 100 克/升 1,2-丙二醇具有 0.5 小時⁻¹ 的殘餘生長率。此生長的抑制可能導因於對生長已知具有高度抑制作用的醋酸鹽副產物。發展以高滴度和產量製造 1,2-丙二醇的厭氧製程將著重於醋酸鹽的議題。已建議將醋酸鹽轉換成較低抑制及原位置易被移除的丙酮(WO 2005/073364)。

Cameron(Cameron 等人，1998；Altaras 和 Cameron，1999；Altaras 和 Cameron，2000)和 Bennett(Huang 等人，1999；Berrios-Rivera 等人，2003)研究小組已完成利用單糖碳源改良大腸桿菌之基因以獲得 1,2-丙二醇生產者的研究。這些研究一方面係依賴二羥丙酮磷酸鹽至 1,2-丙二醇途徑中一或數種酵素活性的表現以及另一方面則依賴在寄主株(host strain)內 NADH 的移除和碳消耗途徑。Cameron 小組獲得的最佳結果為在厭氧培養瓶內具有 0.2 克/克葡萄糖耗量的 1.4 克/升 1,2-丙二醇的產量。當推論至厭氧批式饋料發酵槽時，其具有來自葡萄糖 0.19 克/克產量的 4.5 克/升 1,2-丙二醇而遠高於理論上的預期值。此性能歸因於大腸桿菌之甲基乙二醛合成(MGS)基因的過度表現，大腸桿菌的甘油去氫酶基因(*gldA*)和大腸桿菌的 1,2-丙二醇氧化還原酶基因(*fucO*)則在缺少編碼乳酸去氫酶(*ldhA*)之基因的菌株內。美國專利 US 6,087,140、US

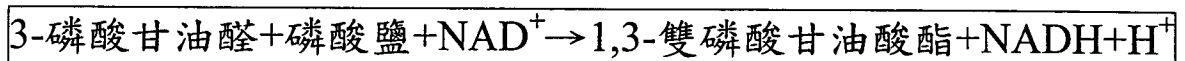
6,303,352 和 WO 98/37204 中亦提及利用相同方法可獲得此結果但僅具有較低的滴度和產量。

Bennett 小組亦利用缺少 *ldhA* 的大腸桿菌寄主株在丙酮丁醇梭菌 (*C. acetobutylicum*) 過度表現 *mgs* 基因及在大腸桿菌表現 *gldA* 基因。在厭氧條件下的燒瓶培養可獲得 0.3 克/升的滴度及 0.12 克/克的產量，然而微氧培養則獲得 1.4 克/升的滴度及 0.13 克/克的產量。

在此階段，全部這些結果均劣於以熱解糖嗜熱菌品種獲得者。

在大腸桿菌內經由糖酵解途徑之葡萄糖的異化作用可在裂解果糖-1,6-雙磷酸鹽之後產生兩種磷酸三碳糖分子，二羥丙酮磷酸鹽 (DHAP) 和 3-磷酸甘油醛。此兩種磷酸三碳糖分子可藉由磷酸三碳糖異構酶的活性被相互轉換。一般認為 DHAP 被轉變成 GA3P 以及該兩種源自葡萄糖的 GA3P 被進一步異化。

亦稱為 GAPDH 的 3-磷酸甘油醛去氫酶係與葡萄糖經糖化轉變成丙酮酸的主要酵素之一。GAPDH 係催化下列的反應：



編碼此酵素的基因於 1983 年被選殖入大腸桿菌 (Branlant 等人, *Gene*, 1983) 及取名為 "gap"。其後鑑定出另一種編碼具有相同酵素活性產物的基因及取名為 *gapB* (Alefounder 等人, *Microbiol.*, 1987)。藉由刪除 *gapA* 和 *gapB* 基因之大腸桿菌株的定性顯示 *gapA* 為糖分解所必需

但是 *gapB* 則非必需 (Seta 等人, *J. Bacter*, 1997)。在專利申請案 WO 2004/033646 中曾報告一種具有向下調節 *gapA* 基因的微生物以藉由發酵從葡萄糖產生 1,3-丙二醇。

本申請案之發明者已指出增加 1,2-丙二醇的產量必需結合兩種因素：

- 改善 1,2-丙二醇之生合成途徑的活性；以及
- 減弱 GAPDH 的活性。

發明者亦證實增加細胞內磷酸烯醇丙酮酸鹽的濃度或利用另類的糖轉運系統可進一步刺激藉由微生物的發酵之 1,2-丙二醇的產量。

【發明內容】

發明之說明

本發明係關於從碳源製造 1,2-丙二醇的微生物，其中該微生物的特徵為：

- (a) 改善從二羥丙酮磷酸鹽至 1,2-丙二醇之生合成途徑的活性；以及
- (b) 減弱 3-磷酸甘油醛去氫酶的活性。

藉由增加與從二羥丙酮磷酸鹽至 1,2-丙二醇生合成途徑有關的至少一種酵素之活性可改良該生合成途徑之活性。藉由增加編碼該酵素之基因的表現可獲得此改善，以及該表現特別指選自 *mgsA*、*yqhD*、*yafB*、*yedW*、*yqhE*、*yeaE*、*yghZ*、*yajO*、*tas*、*ydjG*、*ydbC*、*gldA* 和 *fucO* 的至少一種基

因。其中以增加 *mgsA*、*yqhD* 和 *gldA* 三種基因的表現最佳。

在本發明進一步的態樣中，藉由刪除 *edd* 或 *eda* 基因或二者可消除恩特納-杜多羅夫(Entner-Doudoroff)途徑。此外，藉由刪除編碼與從甲基乙二醛合成乳酸鹽(例如，*gloA*、*aldA*、*aldB*)；從丙酮酸鹽(*ldhA*)、甲酸鹽(*pflA*、*pflB*)、乙醇(*adhE*)和乙酸鹽(*ackA*、*pta*、*poxB*)合成乳酸鹽之有關酵素的基因可減少合成不必要的副產物。

經由磷酸丙糖異構酶的作用減弱 3-磷酸甘油醛的活性以重導一部分可用 3-磷酸甘油醛進入 1,2-丙二醇的合成。因此葡萄糖之 1,2-丙二醇的產量可大於 1 莫耳/莫耳。然而，由於減少磷酸烯醇丙酮酸鹽(PEP)的產量，PEP-依賴糖吸收系統將受到負面影響。因此，在本發明的一態樣中，藉由利用與 PEP 無關的糖吸收如被 *galP* 編碼者，或藉由提供糖磷酸轉移酶系統更多的 PEP 以提高糖的吸收效率。此可藉由消除消耗 PEP 的途徑如丙酮酸鹽激酶(被 *pykA* 和 *pykF* 基因所編碼)及/或藉由促進 PEP 的合成例如藉由編碼 PEP 合成酶之 *ppsA* 基因的過度表現而獲得。

另外，丙酮酸鹽轉變成乙醯基輔酶 A 的酵素若可對抗在厭氧條件下的高 NADH 濃度將具有其價值。此可藉由 *lpd* 基因內的特異性突變而獲得。最後，為了保留將丙酮醇還原成 1,2-丙二醇的 NADH，可刪除 *arcA* 和 *ndh* 基因。

用於製造 1,2-丙二醇的微生物係選自細菌、酵母和真菌，但最佳為來自大腸桿菌或丙酮丁醇梭菌的品種。

本發明的目的亦為藉由在適當生長培養基內培養該改

良微生物以及藉由收獲和純化該產生的 1,2-丙二醇提供一種用於製造 1,2-丙二醇的方法。

發明之詳細說明

5 下列使用的專有名詞可被用於申請專利範圍和專利說明的解釋。

根據本發明”培養”、”生長”和”發酵”可互用以表示細菌在含有單純碳源之適當生長培養基內的生長。

10 根據本發明之”碳源”一詞表示任何可被熟習本技術者利用於幫助微生物正常生長的碳來源，以及其可為六碳糖、五碳糖、單糖、雙糖、寡糖、澱粉或其衍生物、半纖維素、甘油，及其組合。

15 “用於製造 1,2-丙二醇”一詞表示較佳為藉由發酵製造該目標產物的微生物。發酵為在有氧、微氧或無氧條件下進行的一種傳統方法。

“減弱一酵素的活性”指與任何修飾前初菌株的活性比較在改良株內減弱目標酵素的活性。熟習本技術者習知許多獲得此結果的方法。其實例包括：

- 20 - 將突變導入一基因，降低該基因的表現程度或編碼其蛋白質的活性；
- 藉由低強度啟動子置換該基因的天然啟動子而產生較低的表現；
- 利用元件去穩定化其對應信息 RNA 或蛋白質；
- 若不需其任何表現時則刪除該基因。

“表現”一詞指轉錄和轉譯一基因序列而使其產生該基因的對應蛋白產物。

3-磷酸甘油醛去氫酶的活性較佳為在相同條件下與未修飾菌株比較低於 30% 的活性，更佳為低於 10%。

5 “改善從二羥丙酮磷酸鹽至 1,2-丙二醇之生合成途徑的活性”一詞指在該途徑內至少改善一種酵素的活性(請看下文)。

本發明之微生物較佳為被基因改良以增加至少一種從二羥丙酮磷酸鹽至 1,2-丙二醇之生合成途徑的酵素活性。

10 增加酵素的活性較佳為藉由增加編碼該酵素之基因的表現。

熟習本技術者可利用不同方法過度表現該標的基因，例如：

- 以較強啟動子置換該內源性啟動子；
- 15 - 將攜帶該標的基因的表現載體導入該微生物內；
- 將標的基因的其他複本導入染色體內。

目前許多技術被用於將 DNA 導入一菌株內。一種較佳的技術為電穿透法，其已為熟習本技術者所習知。

20 較佳為至少一標的基因被過度表現，其選自：*mgsA*、*yafB*、*yeaE*、*yghZ*、*yqhE*、*yqhD*、*ydhF*、*ycdW*、*yajO*、*ydjG*、*ydbC*、*tas*、*gldA* 和 *fucO*。

mgsA 基因用於編碼 DHAP 轉化成甲基乙二醛的甲基乙二醛合成酶。*yafB*、*yeaE*、*yghZ*、*yqhE*、*yqhD*、*ydhF*、*ycdW*、*yajO*、*ydjG*、*ydbC*、*tas* 基因編碼能將甲基乙二醛

轉化成丙酮醇的酵素活性。*gldA* 基因編碼催化將丙酮醇轉化成 1,2-丙二醇的甘油去氫酶。該 *fucO* 基因編碼催化乳醛酸轉化成 1,2-丙二醇的 1,2-丙二醇氧化還原酶。

5 經修飾微生物較佳為過度表現三種基因：*mgsA*、*yqhD* 和 *gldA*。

根據本發明的微生物較佳為減弱恩特納-杜多羅夫途徑內的至少一種基因。該恩特納-杜多羅夫途徑除了糖解之外提供將葡萄糖分解成 3-磷酸甘油醛和丙酮酸的一種另類方法。恩特納-杜多羅夫途徑的減弱確保大部分或至多全部
10 葡萄糖經由糖化被分解以及被用於製造 1,2-丙二醇。

此途徑的 *edd* 或 *eda* 兩種基因中至少其一被減弱。

根據本發明“減弱一基因的表現”意指一基因的表現部分或完全受到抑制而稱之為被“減弱”。此表現的抑制可為抑制該基因的表現、抑制該基因的激活機制、刪除全部或部分用於基因表現所需的啟動區，或缺失基因的編碼區。
15 一基因的減弱較佳為基本上完全刪除該基因，該基因可被便於鑑定、分離和純化根據本發明之菌株的一選定標記基因所取代。一基因較佳為被同源重組技術所不活化如述於
Datsenko, K.A.和 Wanner, B.L.(2000)”利用 PCR 產物之大腸桿菌 K-12 內染色體基因的單步驟不活化”，*Proc. Natl. Acad. Sci.*美國 97：6640~6645。
20

根據本發明之微生物內較佳為至少一酵素的甲基乙二醛至乳酸鹽的轉化被減弱。此減弱的目的為使可用之甲基乙二醛為合成 1,2-丙二醇所必需的細胞機制所利用(請看

第 1 圖)。

與甲基乙二醛轉化成乳酸鹽有關的基因特別指：

- 編碼具有乙二醛酶活性之酵素的基因，例如編碼催化從甲基乙二醛合成乳醯麩胱苷肽之乙二醛酶 I 的 *gloA* 基因；
- 編碼乳醛酸去氫酶的 *aldA* 和 *aldB* 基因(催化從(S)乳醛酸合成(S)乳酸鹽)。

一或多種這些基因的表現在初菌株內明顯地被減弱。

該 *gloA* 基因較佳為完全被刪除。

在本發明的微生物中，較佳為至少減弱一種合成例如乳酸鹽、乙醇和甲酸鹽副產物的酵素。

明確而言，較佳為減弱編碼催化從丙酮酸合成乳酸鹽之乳酸鹽去氫酶的 *ldhA* 基因，以及編碼催化從乙醯基輔酶 A 合成乙醇之醇-醛去氫酶的 *adhE* 基因。

同樣，可強迫微生物利用丙酮酸去氫酶複合物以從丙酮酸鹽產生乙醯基輔酶 A、CO₂ 和 NADH 而非乙醯基輔酶 A 和甲酸鹽。藉由減弱編碼丙酮酸甲酸鹽裂解酶的 *pflA* 和 *pflB* 基因可達到此目的。

本發明的另一特定具體實施例中，藉由減弱至少一種與其合成有關的酵素可阻止醋酸鹽副產物的合成。較佳為避免合成此類的醋酸鹽以最大化 1,2-丙二醇的產量。

為避免產生醋酸鹽，較佳為減弱至少一種選自 *ackA*、*pta* 和 *poxB* 基因的表現。這些基因全部編碼不同醋酸鹽合成途徑有關的酵素(請看第 1 圖)。

根據本發明的微生物較佳為增加其糖吸收效率。強力減弱 *gapA* 基因的表現導致 GAPDH 反應的碳通量減少 50% 以上，此將導致每吸收 1 莫耳葡萄糖使磷酸烯醇丙酮酸鹽 (PEP) 的合成少於 1 莫耳。由於該吸收在 PEP 至葡萄糖產生葡萄糖-6-磷酸鹽之磷酸的轉移有關，因而 PEP 一般為細胞用於吸收單糖的糖-磷酸轉移酶系統 (PTS) 所必需。因此減少 PEP 的量將對糖的吸收造成負面的影響。

本發明的一特定具體實施例中，微生物藉由與磷酸烯醇丙酮酸鹽無關的糖吸收系統進行糖類的吸收。其可利用被不涉及磷酸化作用之 *galP* 基因所編碼的半乳糖-質子轉運體 (symporter)。在此情況下葡萄糖的吸收必需被編碼 *glk* 基因的葡萄糖激酶所磷酸化。為加強此途徑，選自 *galP* 和 *glk* 之至少一基因的表現被強化。其結果為 PTS 變成非必需以及可能藉由減弱選自 *ptsH*、*ptsI* 或 *crr* 的至少一基因而被消除。

本發明的另一特定具體實施例中，藉由增加代謝物磷酸烯醇丙酮酸鹽的可利用率從而提高糖-磷酸轉移酶系統 (PTS) 的效率。由於 *gapA* 活性被減弱以及至丙酮酸鹽的較少碳通量，因此本發明之改良株的 PEP 量受到抑制而導致較少量的葡萄糖被吸收入細胞內。

可利用各種方法增加微生物菌株內的可利用 PEP。明確而言，其為一種減弱 PEP → 丙酮酸鹽反應的方法。該菌株內至少減弱一種編碼丙酮酸激酶之選自 *pykA* 和 *pykF* 的基因以獲得此結果。另一種方法為增加被磷酸烯醇丙酮酸

合成酶催化之有利於 PEP→丙酮酸鹽反應的可利用 PEP 以提高該酵素的活性。此酵素係編碼 *ppsA* 基因。因此，*ppsA* 基因被優先地提高在微生物內的表現。微生物內可同時存在該兩種修飾作用。

5 在厭氧或微氧條件下，將丙酮酸鹽轉化成乙醯基輔酶 A 的丙酮酸去氫酶複合物(PDC)較佳為對 NADH 具有低敏感性。較低的敏感性係相對未修飾酵素之敏感性的比較。藉由 *lpd* 基因(編碼 PDC 的次單位硫辛醯胺去氫酶)導入一特異性突變可獲得此類的特性而導致酵素之蛋白序列內的丙胺酸 55 被纈胺酸殘基所取代。

10 在厭氧或微氧條件下，明顯增加用於將該前體還原成 1,2-丙二醇的 NADH 可用性。此可藉由減輕全局調控子(global regulator)ArcA(編碼 *arcA* 基因)介導之三甲酸循環的抑制作用而獲得。藉由不活化編碼 *ndh* 基因的 NADH 去氫酶 II 亦可增加細胞內的 NADH 濃度。因此，較佳為至少一種選自 *arcA* 和 *ndh* 的基因被減弱。

15 根據本發明的微生物較佳為選自細菌、酵母或真菌。該微生物更佳為選自由腸桿菌科、芽孢桿菌科、梭狀桿菌科、鏈黴菌科和棒狀桿菌科所構成的群組。該微生物又更佳為大腸桿菌或丙酮丁醇梭菌。

20 本發明另一目的為一種製造 1,2-丙二醇的方法，其中前述微生物係生長於含有單糖碳源的一適當生長培養基內，以及收集其所產生的 1,2-丙二醇。該 1,2-丙二醇的產生係在有氧、微氧或無氧條件下進行。

熟習本技術者已輕易瞭解該發酵製程的培養條件。明確而言，細菌的發酵溫度為介於 20°C 和 55°C 之間，較佳為介於 25°C 和 40°C 之間，以及丙酮丁醇梭菌為約 35°C 和大腸桿菌為約 37°C。

5 此過程可於分批製程、饋料分批製程或連續製程中被加工。

“在有氧條件下”意指藉由溶入液相內的空氣提供培養基所需的氧。此可藉由：(1) 將含氧氣體(如空氣)吹入該液相內；或(2) 振盪含培養基的瓶玻璃瓶以將上部空間的氧氣
10 傳送至液相內。以有氧條件代替厭氧條件之發酵的優點為該氧可作為電子受體以促使菌株產生更多細菌生理作用上所需的 ATP。因此可改善菌株的一般代謝狀態。

微氧條件定義為被溶解入液相內之低氧分率(例如，利用含 0.1 至 10% 氧之以氮補充至 100% 的氣體混合物)的培養條件。
15

厭氧條件定義為無氧氣供給至培養基的培養條件。嚴格厭氧條件定義為將惰性氣體如氮吹入培養基內以除去其他微量氣體的培養條件。可利用硝酸鹽作為電子受體以促進菌株產生 ATP 及改善其代謝。

20 根據本發明的“適當生長培養基”表示適合微生物生長的已知分子組成物之培養基。例如適合細菌生長之已知固定組成物的無機培養基含有至少一種碳源。明確而言，該無機生長培養基與 M9 培養基(Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 美國 32 : 120~128)、M63 培養基(Miller, 1992 ;

細菌遺傳學的短程療法：大腸桿菌和相關細菌的實驗室摘要和手冊，冷泉港實驗室出版，冷泉港，紐約)或例如 Schaefer 等人(1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88~96)所定義之培養基，以及下述稱為 MPG 的基礎培養基具有相同或類似的組成物：

5

K_2HPO_4	1.4 克/升
氰基三乙酸	0.2 克/升
微量元素溶液*	10 毫升/升
$(NH_4)_2SO_4$	1 克/升
NaCl	0.2 克/升
NaHCO ₃	0.2 克/升
MgSO ₄	0.2 克/升
葡萄糖	20 至 100 克/升
NaNO ₃	0.424 克/升
硫胺素(thiamine)	10 毫克/升
FeSO ₄ , 7H ₂ O	50 毫克/升
酵母萃取物	4 克/升

以氫氧化鈉將培養基的 pH 調整至 7.4。

* 微量元素溶液：4.37 克/升檸檬酸、3 克/升 MnSO₄、1 克/升 CaCl₂、0.1 克/升 CoCl₂·2H₂O、0.10 克/升 ZnSO₄·7H₂O、10 毫克/升 CuSO₄·5H₂O、10 毫克/升 H₃BO₃、8.31 毫克/升 Na₂MoO₄。

10

在本發明的一特定具體實施例中，該方法係利用大腸桿菌株生長於含有阿拉伯糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、乳糖、麥芽糖、蔗糖或木糖之單糖碳源的培養基內。

在本發明的另一特定具體實施例中，該方法係利用丙酮丁醇梭菌株生長於含有單糖或複合碳源的培養基內。

15

該生長培養基因此與梭狀桿菌生長培養基(CGM Wiesenborn 等人, Appl. Environm. Microbiol., 54: 2717~2722), 或例如 Monot 等人(Appl. Environm. Microbiol., 44: 1318~1324)或 Vasconcelos 等人(J. Bacteriol, 176: 1443~1450)所述的無機生長培養基具有相同或類似的組成物。

用於培養丙酮丁醇梭菌的碳源為單糖或複合糖碳源。該單糖碳源可為阿拉伯糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、乳糖、麥芽糖、蔗糖或木糖。最佳的單糖碳源為葡萄糖。複合糖碳源可為澱粉或半纖維素。最佳的複合糖碳源為澱粉。

收獲的 1,2-丙二醇較佳為進一步被純化。收集和純化 1,2-丙二醇的各種方法已為熟習本技術者所習知。本發明上文、下文及實例中的說明係利用大腸桿菌。因此用於根據本發明最初和發展菌株之可被減弱、刪除或過度表現的基因主要係利用來自大腸桿菌的命名基因所定義。然而，此名稱具有根據本發明的一般意義以及涵蓋其他微生物內的對應基因。利用來自大腸桿菌基因的參考基因庫，技術者可判定除大腸桿菌之外的等效基因。

鑑定同源序列及其相似度的方法已為技術者所習知，以及特別包括可用於指定預設參數之網站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 的 BLAST 軟體。獲得的序列可利用例如 CLUSTALW(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 軟體進行探測(比對)，其預設參數示於該網站上。

PFAM 資料庫(比對和隱藏式 Markov 模式的蛋白家族資料庫 <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) 為一種比對

大量蛋白序列的收藏庫。各 PFAM 可清礎呈現多重比對、觀察蛋白質結構域、評估在菌體內的分佈、存取其他資料庫以及清礎呈現已知的蛋白構造。

藉由比較源自 66 種全序列測序單細胞基因組之代表
5 44 種主要親緣系的蛋白質序列可獲得 COGs(蛋白質的直系同源簇 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)。從至少三種譜系定義各 COG 而使其可辨認古保守結構域。

【實施方式】

10 實例 1：構建下列改良菌株—大腸桿菌 MG1655 *P_{trc16}-gapA::cm(pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA)*、大腸桿菌 MG 1655 *P_{trc16}-gapA::cm(pME101VB01-yafB-mgsA-gldA)*和
大腸桿菌 MG1655 *P_{trc16}-gapA::cm(pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA)*

15 利用 *trc* 啟動子之表現自質體 pME101VB01 的不同基因組合增加 1,2-丙二醇的產量。

(a) 構建大腸桿菌 MG1655(pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA)、MG1655(pME101VB01-yafB-mgsA-gldA) 和
20 MG 1655(pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA)的改良菌株

構建質體 pME101VB01

質體 pME101VB01 係源自質體 pME101 以及隱藏含有跟隨著丙酮丁醇梭菌 ATCC824 之轉錄終止子專用於罕見限制性核酸內切酶 *nheI*、*snaBI*、*pacI*、*bglIII*、*avrII*、*sacII*

和 *ageI* 之識別部位序列的多選殖位點。

為表現低套組載體可依如下方法構建質粒 pME101。利用寡核苷酸 PME101F 和 PME101R 以 PCR 擴增 *pCL1920* 質粒 (Lerner 和 Inouye, 1990, *NAR* 18, 15 : 4631 頁—
5 GenBank AX085428) 以及來自 *pTrc99A* 載體 (Amersham Pharmacia 科技公司, 紐澤西州 Piscataway 市) 隱藏 *lacI* 基因和 *trc* 啟動子的 *BstZ17I-XmnI* 片段被插入該擴增載體內。

PME101F(序列辨識編號 1) :

ccgacagtaagacgggtaagcctg

10 PME101R(序列辨識編號 2) :

agcttagtaaagccctcgctag

利用含有多選殖位點和 *adc* 轉錄終止子的合成雙股核酸連接子產生 pME101VB01。連接被 *NcoI* 或 *HindIII* 消化限制位點所互補側接的兩條 100 個鹼基寡核苷酸。將該
15 100-鹼基對產物次選殖入 *NcoI/HindIII* 消化質粒 pME101 內而產生 pME101VB01。

由 100 個鹼基構成的 pME101VB01 1(序列辨識編號 3) :

20 catgggctagctacgtattaattaaagatctcctagggagctcaccggTAA
AAATAAGAGTTACCTTAAATGGTAACTCTTATTTTTTT
Aggcgcgcca

由 100 個鹼基構成的 pME101VB01 2(序列辨識編號 4) :

agcttggcgcgccTAAAAAATAAGAGTTACCATTAA
 GGTA ACTCTTATTTTAAaccggtgagctccctaggagatctttaattaat
acgtagctagcc

其具有：

- 5 - 相當於多選殖位點的區域(底線小寫字母)；
- 相當於丙酮丁醇梭菌 ATCC824 pSOL1(NC_001988)
 之 *adc* 轉錄終止子(序列 179847 至 179814)的區域(大寫字
 母)。

10 構建用於表現 1,2-丙二醇生合成途徑之不同基因組合的質
 粒 (pME101VB01-*yqhD-mgsA-gldA* ; pME101VB01-*yafB-*
mgsA-gldA 和 pME101VB01-*yqhE-mgsA-gldA*)

從大腸桿菌 MG1655 的基因組 DNA 利用表 1 的寡核
 苷酸 PCR 擴增不同的基因。

15 表 1：用於擴增 1,2-丙二醇途徑基因的寡核苷酸

基因 名稱	寡核苷酸 名稱	序列辨識 編號	同源基因	限制位點
<i>yqhD</i>	<i>yqhDR2</i> <i>yqhDF2</i>	N°5 N°6	3153369-3153400 3154544-3154475	加入 <i>bspHI</i> 移除 <i>bspHI</i> 加入 <i>nheI</i>
<i>mgsA</i>	<i>mbsAF</i> <i>mgsAR</i>	N°7 N°8	1026268-1026248 1025780-1025800	加入 <i>snaBI</i> 加入 <i>bglIII</i>
<i>gldA</i>	<i>gldAF</i> <i>gldAR</i>	N°9 N°10	4136631-4136612 4135512-4135530	加入 <i>avrII</i> 加入 <i>sacI</i>
<i>yafB</i>	<i>yafB F2</i> <i>yafB R</i>	N°11 N°12	229167-229190 229970-229950	加入 <i>ncoI</i> 加入 <i>nheI</i>
<i>yqhE</i>	<i>yqhE F</i> <i>yqhE R</i>	N°13 N°14	3154641-3154661 3155464-3155444	加入 <i>ncoI</i> 加入 <i>nheI</i>

以表 1 的限制酵素切割 PCR 擴增片段然後選殖入質粒 pME101VB01 的限制位點內。可建構出下列的質粒：pME 101VB01-*yqhD-mgsA-gldA*、pME101VB01-*yafB-mgsA-gldA* 和 pME101VB01-*yqhE-mgsA-gldA*。

5 然後將質粒導入大腸桿菌 MG1655 菌株內。

(b) 構建大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-*gapA*::cm 改良菌株

藉由以 FRT-CmR-FRT 和基因工程啟動子取代 225 pb 的上游 *gapA* 序列利用合成的短 Ptrc16 啟動子 (序列辨識編號 15：gagctgttgacgattaatcatccggctcaaataatgtgtgg) 代替天然 *gapA* 啟動子導入大腸桿菌 MG1655 菌株內。此技術說明於 Datsenko K.A. 和 Wanner B.L. (2000)。

根據方法 1 用於取代天然 *gapA* 啟動子的兩種寡核苷酸列於表 2。

15 方法 1：導入 PCR 產物用於重組體的重組和選殖

利用選定和列於表 2 的寡核苷酸取代一基因或基因間區段以擴增來自質粒 pKD3 的氯黴素抗性基因盒或來自質粒 pKD4 的卡那黴素抗性基因盒 (Datsenko K.A. 和 Wanner B.L. (2000))。然後將獲得的 PCR 產物藉由電穿透法導入攜帶其系統 77Red(72,67 exo) 有利於表達同源重組之質粒 pKD46 的受體菌株。然後選擇抗藥性轉形株及以列於表 3 的適當寡核苷酸藉由 PCR 分析檢查插入的抗性基因盒。

20 獲得的菌株取名為大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-

gapA::cm。

將表 3 的質粒分開導入大腸桿菌 MG1655 P_{trc16}-*gapA::cm* 菌株內。

5

表 2：藉由重組以 PCR 產物於大腸桿菌 MG1655 菌株用於取代染色體區段的寡核苷酸

區段名稱	寡核苷酸名稱	序列編號	同源染色體區段
<i>gapA</i> 啟動子 (P _{trc16} - <i>gapA</i>)	P _{trc} - <i>gapA</i> F	N°16	1860478-1860536
	P _{trc16} - <i>gapA</i> R	N°17	1860762-1860800
<i>edd</i> 和 <i>eda</i> 基因	D _{edd} F	N°18	1932582-1932501
	D _{eda} R	N°19	1930144-1930223
<i>gloA</i> 基因	GLOADf	N°20	1725861-1725940
	GLOADR	N°21	1726268-1726189
<i>aldA</i> 基因	AldADf	N°22	1486256-1486336
	aldADr	N°23	1487695-1487615
<i>aldB</i> 基因	AldBDf	N°24	3752603-3752682
	aldBDr	N°25	3754141-3754062
<i>ldhA</i> 基因	DldhAF	N°26	1440865-1440786
	DldhAR	N°27	1439878-1439958
<i>pflAB</i> 基因	DpflBr	N°28	952315-952236
	DpflAf	N°29	949470-949549
<i>adhE</i> 基因	DadhEr	N°30	1297344-1297264
	DadhEf	N°31	1297694-1297773
<i>ackA-pta</i> 基因	DackAF	N°32	2411494-2411573
	DptaR	N°33	2414906-2414830
<i>poxB</i> 基因	DpoxBF	N°34	908557-908635
	DpoxBR	N°35	910262-910180
<i>pykA</i> 基因	DpykAF	N°36	1935756-1935836
	DpykAR	N°37	1755129-1755051
<i>pykF</i> 基因	DpykFF	N°38	1753689-1753766
	DpykFR	N°39	1755129-1755051

表 3：用於檢查插入之抗性基因盒(resistance cassette)或喪失抗性基因盒的寡核苷酸

區段名稱	寡核苷酸名稱	序列編號	同源染色體區段
<i>gapA</i> 啟動子 (Ptrc16- <i>gapA</i>)	<i>yeaAF</i>	N°40	1860259-1860287
	<i>gapAR</i>	N°41	1861068-0861040
<i>edd</i> 和 <i>eda</i> 基因	<i>eddF</i>	N°42	1932996-1932968
	<i>edaR</i>	N°43	1929754-1929777
<i>gloA</i> 基因	NemAQd	N°44	1725331-1725361
	Rnt Cr	N°45	1726795-1726765
<i>aldA</i> 基因	Ydc F C f	N°46	1485722-1485752
	<i>gapCCr</i>	N°47	1488225-1488195
<i>aldB</i> 基因	<i>aldB C f</i>	N°48	3752056-3752095
	YiaYCr	N°49	3754674-3754644
<i>ldhA</i> 基因	<i>ldhAF</i>	N°50	1439724-1439743
	<i>ldhAR</i>	N°51	1441029-1441007
<i>pflAB</i> 基因	<i>pflAB1</i>	N°52	948462-958491
	<i>pflAB2</i>	N°53	953689-983660
<i>adhE</i> 基因	<i>ychGf</i>	N°54	1294357-1294378
	<i>adhECr</i>	N°55	1297772-1297749
<i>ackA-pta</i> 基因	B2295	N°56	2410900-2410919
	YfcCR	N°57	2415164-2415145
<i>poxB</i> 基因	<i>poxBF</i>	N°58	908475-908495
	<i>poxBR</i>	N°59	910375-910352
<i>pykA</i> 基因	<i>pykAF</i>	N°60	1935338-1935360
	<i>pykAR</i>	N°61	1937425-1937401
<i>pykF</i> 基因	<i>pykFF</i>	N°62	1753371-1753392
	<i>pykFR</i>	N°63	1755518-1755495

5 實例 2：構建下列具有 1,2-丙二醇高產量的改良菌株—大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-*gapA*, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *pykA*, Δ *pykF* (pME101VB01-*yqhD-mgsA-gldA*),(pJB137-P*gapA-ppsA*)
 ；大腸桿菌 MG 1655 Ptrc16-*gapA*, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*(pME101VB01-*yafB-mgsA-gldA*),(pJB137-P*gapA-ppsA*)；以及大腸桿菌 MG 1655 Ptrc16-*gapA* , Δ *edd-eda*,

$\Delta gloA, \Delta pykA, \Delta pykF$ (pME101VB01-*yqhE-mgsA-gldA*),
(pJB137-*PgapA-ppsA*)

利用方法 1 所述技術以表 2 的寡核苷酸藉由插入卡那
黴素抗性基因盒及刪除大部分有關基因在大腸桿菌
5 MG1655 菌株內不活化 *edd-eda* 基因。此獲得的基因被稱
為 MG1655 $\Delta edd-eda::km$ 。

根據方法 2 將此缺失部分轉移入大腸桿菌 MG1655
Ptrc16-*gapA::cm* 菌株。

10 方法 2：利用噬菌體 P1 的轉導刪除一基因

藉由噬菌體 P1 的轉導技術利用受體大腸桿菌株內的
抗性基因盒(卡那黴素或氯黴素)取代該基因以刪除該選定
的基因。此方法分為兩步驟：(i) 在缺失單基因的 MG1655
菌株上製造噬菌體裂解液；以及(ii) 藉由此噬菌體裂解液
15 轉導受體菌株。

製備噬菌體裂解液

- 將 100 微升之具有單基因缺失的 MG1655 菌株隔夜培養
種植於 10 毫升之 LB+30 微克/毫升之 Cm+0.2% 葡萄糖+5
毫克分子 $CaCl_2$ ；
- 20 - 在 37°C 的振盪下培養 30 分鐘；
- 加入在野生型 MG1655 菌株上製造的 100 微升噬菌體裂
解液 P1(約 1×10^9 個噬菌體/毫升)；
- 在 37°C 振盪 3 小時直至細胞被溶解為止；

- 加入 200 微升的氯仿，然後劇烈攪拌；
- 在 4500 克離心 10 分鐘以除去細胞殘渣；
- 將上清液置入滅菌試管內然後加入 200 微升的氯仿；
- 將裂解液儲存於 4°C。

5

轉導

- 將 5 毫升的 LB 培養基內大腸桿菌受體菌株之隔夜培養在 1500 克離心 10 分鐘；
- 將細胞顆粒懸浮於 2.5 毫升的 10 毫克分子 $MgSO_4$ 、5 毫克分子 $CaCl_2$ ；
- 對照試管：100 微升細胞
單基因缺失 MG1655 菌株的 100 微升噬菌體 P1；
- 受測試管：100 微升細胞+單基因缺失 MG1655 菌株的 100 微升噬菌體 P1；
- 不振盪下於 30°C 培養 30 分鐘；
- 各試管內加入 100 微升的 1 克分子檸檬酸鈉，然後劇烈振盪；
- 加入 1 毫升的 LB；
- 在 37°C 的振盪下培養 1 小時；
- 試管在 7000rpm 離心 3 分鐘之後於皿上種植 LB+30 微克/毫升 Cm；
- 在 37°C 下培養隔夜。

10

15

20

然後選取該抗藥性轉形株及以適當寡核苷酸藉由 PCR 分析檢查該插入的缺失基因。

獲得的菌株取名為大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-*gapA*::
cm, Δ *edd-eda*::*km*。

然後根據方法 3 消除抗藥性盒。

5 方法 3：消除抗藥性盒

根據下列技術消除氯黴素及/或卡那黴素的抗藥性
盒。將攜帶 FLP 重組酶作為氯黴素及/或卡那黴素抗藥性
基因盒之 FRT 位點的 pCP20 質粒藉由電穿透法導入該重
組菌株。在 42°C 下連續培養之後，藉由 PCR 分析以表 3
10 的寡核苷酸檢查抗藥性基因盒的喪失。

根據方法 1 以列於表 2 的寡核苷酸構建 MG1655 Δ
gloA::cm 菌株以及將此缺失轉移入先前根據方法 2 構建的
菌株。獲得的菌株取名為大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-*gapA*,
 Δ *edd-eda*, Δ *gloA*::cm。

15 根據方法 1 以表 2 的寡核苷酸藉由插入抗卡那黴素基
因盒將 *pykA* 基因不活化成先前菌株。此獲得的菌株取名
為大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-*gapA*, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*::cm,
 Δ *pykA*::*km*。

然後根據方法 3 消除該抗藥性基因盒。

20 根據方法 1 以表 2 的寡核苷酸藉由插入抗氯黴素基因
盒將 *pykA* 基因不活化。此獲得的菌株取名為大腸桿菌
MG1655 Ptrc16-*gapA*, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*::cm。

然後根據方法 3 消除該抗藥性基因盒。

利用表 3 的寡核苷酸檢查先前於各步驟中所構建全部

缺失的存在。

利用 *gapA* 啟動子從 pJB137 質粒表現 *ppsA* 基因以增加磷酸烯醇丙酮酸鹽的產量。就構建 pJB137-P*gapA-ppsA* 質粒而言，從大腸桿菌 MG1655 的基因組 DNA 利用表 1

5 的寡核苷酸 PCR 擴增該 *ppsA* 基因：

1. 由 65 個鹼基構成的 *gapA-ppsAF*(序列辨識編號 64)
 ccttttattcactaacaataagctgggtggaatatATGTCCAACAATGGC
 TCGTCACCGCTGGTGC

具有：

- 10 - 與 *ppsA* 基因 (1785136-1782758) 之序列 (1785106-1785136) 同源的區域(大寫字母)，參考序列請看網站 <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>；以及
- 與 *gapA* 啟動子(1860794-1860761)同源的區域(小寫字母)。

15 2. 由 43 個鹼基構成的 *ppsAR*(序列辨識編號 65)

aatcgcaagcttGAATCCGGTTATTTCTTCAGTTCAGCCA
 GGC

具有：

- 20 - 與 *ppsA* 區域 (1785136-1782758) 之序列 (1782758-1782780) 同源的區域(大寫字母)；
- 一限制位點 *HindIII*(底線字母)。

在此同時利用下列寡核苷酸擴增大腸桿菌 *gapA* 基因的 *gapA* 啟動子區域：

1. 由 65 個鹼基構成的 *gapA-ppsAR*(序列辨識編號 66)

GCACCAGCGGTGACGAGCCATTGTTGGACATatattcca
ccagctatttgtagtgaataaaaagg

具有：

- 與 *ppsA* 基因 (1785136-1782758) 之序列 (1785106-
5 1785136) 同源的區域(大寫字母)；以及
- 與 *gapA* 啟動子(1860794-1860761)同源的區域(小寫
字母)。

2. 由 33 個鹼基構成的 *gapAF*(序列辨識編號 67)

ACGTCCCCGGGGcaagcccaaaggaagagtgaggc

具有：

- 與 *gapA* 啟動子(1860639-1860661)同源的區域(小寫
字母)；
- 一限制位點 *SmaI*(底線字母)。

15 兩種片段均於其後利用寡核苷酸 *ppsAR* 和 *gapAF* 被
融合(Horton 等人 1989, *Gene* 77: 61~68)。以限制酵素
HindIII 和 *SmaI* 切割該 PCR 擴增片段然後被選殖入載體
pJB137 (EMBL 登錄號: U75326)的 *HindIII/SmaI* 位點而獲
得載體 pJB137-P*gapA-ppsA*。

20 將不同 pME101VB01 質粒和 pJB137-P*gapA-ppsA* 導入
大腸桿菌 MG1655 PgapA, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *pykA*,
 Δ *pykF* 菌株。獲得的菌株分別被取名為大腸桿菌 MG1655
PgapA, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*,pME101VB01-
yqhD-mgsA-gldA,pJB137-P*gapA-ppsA*(菌株 1)；大腸桿菌
MG1655 PgapA, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*,pME

101VB01-*yafB*-*mgsA*-*gldA*, pJB137-*PgapA*-*ppsA* (菌株 2); 以及大腸桿菌 MG1655 *P*_{trc16}-*gapA*, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, pME101VB01-*yqhE*-*mgsA*-*gldA*, pJB137-*PgapA*-*ppsA* (菌株 3)。

5 實例 3：構建能以產量高於 1 莫耳/莫耳葡萄糖產生 1,2-丙二醇的改良菌株—大腸桿菌 MG1655 *P*_{trc16}-*gapA*, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB*, Δ *ldhA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *pykA*, Δ *pykF* (pME101VB01-*yqhD*-*mgsA*-*gldA*), (pJB137-*PgapA*-*ppsA*); 大腸桿菌 MG1655 *P*_{trc16}-*gapA*, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB*, Δ *ldhA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *pykA*, Δ *pykF* (pME101VB01-*yafB*-*mgsA*-*gldA*), (pJB137-*PgapA*-*ppsA*); 以及大腸桿菌 MG1655 *P*_{trc16}-*gapA*, Δ *edd-eda*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB*, Δ *ldhA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *pykA*, Δ *pykF* (pME101VB01-*yqhE*-*mgsA*-*gldA*), (pJB137-*PgapA*-*ppsA*)

根據方法 1 以列於表 2 的寡核苷酸構建 MG1655 Δ *aldA*::*km*、MG1655 Δ *aldB*::*cm*、MG1655 Δ *pflAB*::*km*、MG1655 Δ *adhE*::*cm*、MG1655 Δ *ackA-pta*::*cm* 以及將此缺失轉移入先前根據方法 2 構建的菌株。需要時根據方法 3 消除抗藥性基因盒。

根據方法 1 以表 2 的寡核苷酸藉由插入抗氯黴素基因盒在先前構建的菌株內不活化 *ldhA* 基因和 *poxB* 基因。需要時根據方法 3 消除抗藥性基因盒。

利用表 3 的寡核苷酸檢查先前於各步驟中所構建全部
缺失的存在。

獲得的菌株被取名為大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-gapA,
 $\Delta edd-eda, \Delta gloA, \Delta aldA, \Delta aldB, \Delta ldhA, \Delta pflAB, \Delta adhE, \Delta ackA$
5 $-\Delta pta, \Delta poxB, \Delta pykA, \Delta pykF$ 。

將不同 pME101VB01 質粒和 pJB137-PgapA-ppsA 導入
大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-gapA, $\Delta edd-eda, \Delta gloA, \Delta aldA, \Delta aldB,$
 $\Delta ldhA, \Delta pflAB, \Delta adhE, \Delta ackA-pta, \Delta poxB, \Delta pykA, \Delta pykF$ 。獲
得的菌株分別被取名為大腸桿菌 MG1655

10 Ptrc16-gapA, $\Delta edd-eda, \Delta gloA, \Delta aldA, \Delta aldB, \Delta ldhA, \Delta pflAB,$
 $\Delta adhE, \Delta ackA-pta, \Delta poxB, \Delta pykA, \Delta pykF, pME101VB01-$
 $yqhD-mgsA-gldA, pJB137-PgapA-ppsA$ ；大腸桿菌 MG1655
Ptrc16-gapA, $\Delta edd-eda, \Delta gloA, \Delta aldA, \Delta aldB, \Delta ldhA, \Delta pflAB,$
 $\Delta adhE, \Delta ackA-pta, \Delta poxB, \Delta pykA, \Delta pykF, pME101VB01-$
15 $yafB-mgsA-gldA, pJB137-PgapA-ppsA$ ；以及大腸桿菌
MG1655 Ptrc16-gapA, $\Delta edd-eda, \Delta gloA, \Delta aldA, \Delta aldB,$
 $\Delta ldhA, \Delta pflAB, \Delta adhE, \Delta ackA-pta, \Delta poxB, \Delta pykA, \Delta pykF, pME$
101VB01- $yqhE-mgsA-gldA, pJB137-PgapA-ppsA$ 。

實例 4：在有氧條件下不同菌株之 1,2-丙二醇產量的比較

20 在有氧條件下於含有葡萄糖作為碳源的基本培養基
內將實例 2 中獲得的菌株(菌株 1、2 和 3)以及對照菌株(對
照 1：MG1655 pME101VB01- $yqhD-mgsA-gldA$ 、對照 2：
MG 1655 pME101VB01- $yafB-mgsA-gldA$ 、對照 3：MG1655
pME 101VB01- $yqhE-mgsA-gldA$ ，和對照 4：MG1655 Ptrc16-

5 *gapA*, $\Delta edd-eda$, $\Delta gloA$, $\Delta pykA$, $\Delta pykF$) 培養於厄氏錐形檢測燒瓶內。在 34°C 或 37°C 下進行培養及藉由 MOPS 緩衝培養基以維持其 pH。在培養結束時，藉由 HPLC 分析發酵液內的 1,2-丙二醇、丙酮醇和殘留葡萄糖以及計算葡萄糖之 1,2-丙二醇和葡萄糖之 1,2-丙二醇+丙酮醇的產量。然後選擇最佳菌株進行發酵槽的饋料批式(fed-batch)培養。

菌株	1,2-丙二醇 力價(克/升)	丙酮醇 力價(克/升)	1,2-丙二醇產量 (克/克葡萄糖)	1,2-丙二醇+丙酮醇 產量(克/克葡萄糖)
對照 1	0.02	0	0.004	0.004
對照 2	0	0	0	0
對照 3	0.01	0	0.002	0.002
對照 4	0.05	0.34	0	0.04
菌株 1	2.25	1.40	0.14	0.23
菌株 2	1.64	1.31	0.10	0.18
菌株 3	0.77	0.47	0.06	0.10

實例 5：在饋料批式培養內以最佳菌株製造 1,2-丙二醇

10 利用饋料批式培養將先前試驗中選取的最佳菌株培養於 21 個發酵槽內。

15 將培養基維持在 37°C 的恒定溫度以及利用 NH₄OH 溶液使其 pH 長期維持在 6.5 和 8 之間。在分批階段攪拌速度維持在 200 和 300 rpm 之間以及在饋料批式階段結束時增加至 1000 rpm。利用氣體調節器將溶氧濃度維持在 30 和 10%飽和度之間的值。當光學密度達到 3 至 4 間之值時以 0.3 至 0.5 毫升/小時的初流速啟動該饋料批次然後將流速逐漸增加至 2.5 和 3.5 毫升/小時之間。此時流速可維持

24 至 48 小時的恒定狀態。饋料的培養液係根據葡萄糖含量在 300 至 500 克/升之間濃度的基本培養基。

依內文引述順序排列的參考文獻

- 5 1. Badia J, Ros J, Aguilar J(1985); *J. Bacteriol.* 161 : 435~437。
2. Tran Din K 和 Gottschalk G(1985); *Arch. Microbiol.* 142 : 87~92。
3. Cameron DC 和 Cooney CL(1986); *Bio/Technology* 4 :
10 651 ~654。
4. Sanchez-Rivera F, Cameron DC, Cooney CL(1987);
Biotechnol. Lett. 9 : 449~454。
5. Altaras NE 和 Cameron DC(1999); *Appl. Environ.*
Microbiol. 65 : 1180~1185。
- 15 6. Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw
AJ(1998); *Biotechnol. Prog.* 14 : 116~125。
7. Altaras NE 和 Cameron DC(2000); *Biotechnol. Prog.*
16 : 940~946。
8. Huang K, Rudolph FB, Bennett GN(1999); *Appl. Environ.*
20 *Microbiol.* 65 : 3244~3247。
9. Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN(2003); *J. Ind.*
Microbiol. Biotechnol. 30 : 34~40。
10. Branlant G, Flesch G, Branlant C(1983); *Gene* 25 : 1~7。
11. Alefounder PR 和 Perham RN(1989); *Mol. Microbiol.* 3 :

723~732。

12. Seta FD, Boschi-Muller F, Vignais ML, Branlant G (1997); *J. Bacteriol.* 179 : 5218~5221。
13. Datsenko KA 和 Wanner BL(2000); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640~6645。
14. Anderson EH(1946); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32 : 120~128。
15. Miller(1992); *細菌遺傳學的短程療法：大腸桿菌和相關細菌的實驗室摘要和手冊*，冷泉港實驗室出版，冷泉港，紐約。
16. Schaefer U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz D(1999); *Anal. Biochem.* 270 : 88~96。
17. Wiesenborn DP, Rudolph RB, Papoutsakis ET(1987); *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2717~2722。
18. Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R(1982); *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 1318~1324。
19. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P(1994); *J. Bacteriol.* 176 : 1443~1450。
20. Lerner CG 和 Inouye M(1990); *Nucleic Acids Res.* 18 : 4631。

【圖式簡單說明】

被併入和構成本發明舉例性說明之一部分的附圖以及其專利說明係被用於解釋本發明的原理。

第 1 圖 描述中心代謝在來自碳水化合物之 1,2-丙二
醇製造系統發展的基因工程。

【主要元件符號說明】

5

無

序列表

<110> 代謝探索公司
 <120> 用於製造 1,2-丙二醇的代謝工程微生物
 <130> D25261
 <150> PCT/IB2007/001675
 <151> 2007-03-23
 <160> 67
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人造
 <220>
 <223> PCR 引子
 <400> 1
 ccgacagtaa gacgggtaag cctg 24
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人造
 <220>
 <223> PCR 引子
 <400> 2
 agcttagtaa agccctcgct ag 22
 <210> 3
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> 人造
 <220>
 <223> PCR 引子
 <400> 3
 catgggctag ctacgtatta attaaagatc tcctagggag ctaccgggtt aaaaataaga 60
 gttaccttaa atggtaactc ttatTTTTTT aggcgcgcca 100
 <210> 4
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> 人造
 <220>
 <223> PCR 引子
 <400> 4
 agcttggcgc gcctaaaaaa ataagagtta ccatttaagg taactcttat ttttaaccgg 60
 tgagctccct aggagatcct taattaatac gtagctagcc 100
 <210> 5
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人造
 <220>
 <223> PCR 引子

200909585

<400> 5
cgatgcacgt catgaacaac tttaatctgc acacccaac ccg 43

<210> 6
<211> 79
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 6
ctagctagcg gcgtaaaaag cttagcgggc ggcttcgtat atacggcggc tgacatcaa 60
cgtaatgtcg tgattttcg 79

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 7
cgtacgtact gtaggaaagt taactacgg 29

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 8
gaagatcttt acctcagacg gtccgcgag 29

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 9
gacctaggct ctaaaggagc aattatgg 28

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 10
cgagctctta ttcccactct tgcagg 26

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

200909585

<400> 11
catgccatgg ctatccctgc atttggttta 30

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 12
ctagctagct taatcccatt caggagccag 30

<210> 13
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 13
catgccatgg ctaatccaac cgttattaag c 31

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 14
ctagctagct tagccgccga actggtcagg 30

<210> 15
<211> 41
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 合成启动子

<400> 15
gagctgttga cgattaatca tccggctcga ataatgtgtg g 41

<210> 16
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 16
agtcatatat tccaccagct atttgtagt gaataaaagc cacacattat tgcagccgga 60
tgattaatag tcaacagctc tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 17
<211> 79
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 17

200909585

gctcacatta cgtgactgat tctaacaaaa cattaacacc aactggcaaa attttgtccc 60
atatgaatat cctccttag 79

<210> 18
<211> 102
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 18
cgcgagagac tcgctctgct tatctcgccc ggatagaaca agcgaaaact tcgaccgttc 60
atcgttcgca gttggcatgc ggtgtaggct ggagctgctt cg 102

<210> 19
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 19
gcttagcgcc ttctacagct tcacgcgcca gcttagtaat gcggtcgtaa tcgcccgtt 60
ccagcgcac tcgccgaacc catatgaata tctccttag 100

<210> 20
<211> 101
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 20
atcgctcttc ttcataccat gctgcgcgtt ggcgatttgc aacgctccat cgatttttat 60
accaaaagtgc tgggcatgaa gtgtaggctg gagctgctt c g 101

<210> 21
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 21
ttagttgccc agaccgagac cggcgtcttt ctcttcgatt aactcaattt tgtaaccgtc 60
cggatcttcc acaaacgca catatgaata tctccttag 100

<210> 22
<211> 102
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 22
atgtcagtac ccgttcaaca tcttaigtat atcgatggac agtttgttac ctggcgtgga 60
gacgcatgga ttgatgtgtt agttaggct ggagctgctt cg 102

200909585

<210> 23
<211> 101
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 23
ttaagactgt aaataaacca cctgggtctg cagatattca tgcaagccat gttaccatc 60
tgcgccgcca ataccggatt tcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 24
<211> 101
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 24
tcagaacagc cccaacggtt tatccgagta gctcaccagc aggcacttgg tttgctgta 60
atgctccagc atcatcttgt gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 25
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 25
atgaccaata atcccccttc agcacagatt aagccccggcg agtatggttt ccccccaag 60
ttaaagccc gctatgacaa catatgaata tcttccttag 100

<210> 26
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 26
gaaactcgcc gtttatagca caaaacagta cgacaagaag tacctgcaac aggtgaacga 60
gtcctttggc tttgagctgg tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 27
<211> 101
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 27
ttaaaccagt tegtccggc aggtttcgcc tttttccaga ttgcttaagt tttgcagcgt 60
agtctgagaa atactggica gcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 28
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

200909585

<220>

<223> PCR 引子

<400> 28

ccggacatcc tgcgttgccg taaatctggt gttctgaccg gctcgcgaga tgcataatggc 60

cgtagccgta tcatcggatga catatgaata tcctccttag 100

<210> 29

<211> 100

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 29

gatgcactat aagatgtgtt aaaaacgctg tagcagaatg aagcgcggaa taaaaaagcg 60

gcaactcaat aaagttgccg tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 30

<211> 101

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 30

atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcaactcgtag agcgtgtaaa aaaagcccag 60

cgtagaatatg ccagtttcac tcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 31

<211> 100

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 31

caataacgaa tgatagcaat tttaaagtagt taggaggtga aaaatgctgt caaaaggcgt 60

attgtcagcg cgtcttttca tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 32

<211> 100

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 32

cgagtaagtt agtactgggt ctgaaactgcg gtagttcttc actgaaattt gccatcatcg 60

atgcagtaaa tggatgaagag tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 33

<211> 97

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 33

gctgctgtgc agactgaatc gcagtcagcg cgatgggtga gacgatatcg tcaaccagtg 60

cgccacggga caggtcgcat atgaatatcc tccttag 97

<210> 34
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> PCR 引子

<400> 34
 ccttagccag ttgttttgc ccagttcgat cacttcatca ccgctccgc tgatgattgc 60

gcgcagcata tacaggctgc atatgaatat ctccttag 99

<210> 35
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> PCR 引子

<400> 35
 cggttgcagc ttatatgcc aaaacactcg aatcggcagg ggtgaaacgc atctggggag 60

tcacaggcga ctctctgaac ggtgtaggct ggagctgctt cg 102

<210> 36
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> PCR 引子

<400> 36
 cgcggcgggt gccaacgttg tacgtatgaa cttttctcac ggctcgctg aagatcacia 60

aatgcgcgcg gataaagttc gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 37
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> PCR 引子

<400> 37
 cgccgatcc ggcaacgtac ttactctacc gttaaaatac gcgtggtatt agtagaaccc 60

acggtactca tcacgtgcc ccatatgaat atctcctta g 101

<210> 38
 <211> 98
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> PCR 引子

<400> 38
 cccatcttc tcaacttaaa gactaagact gtcataaaaa agacaaaat tgtttgcacc 60

atcggaccga aaaccgaatg taggctggag ctgcttcg 98

<210> 39

200909585

<211> 99
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 39
ggacgtgaac agatgCGgtg ttagtagtgc cgctcGgtac cagtgcacca gaaaccataa 60
ctacaacgtc acctttgtgc atatgaatat cctccttag 99

<210> 40
<211> 29
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 40
gccacagccg gaatcatact tggtttggg 29

<210> 41
<211> 29
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 41
cgtaacacc aacttcgtcc catttcagg 29

<210> 42
<211> 29
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 42
gggtagactc cattactgag gcgtgggCG 29

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 43
ccacatgata cgggatggt gacg 24

<210> 44
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 44
gaagtggtcg atgccgggat tgaagaatgg g 31

<210> 45
<211> 31

200909585

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR 引子

<400> 45
gggttacgtt tcagtgaggc gcgttcgcg g 31

<210> 46
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 46
tgcagcggcg cacgatggcg acgttcgcc g 31

<210> 47
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 47
cacgatgacg accattcatg cctatactgg c 31

<210> 48
<211> 40
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 48
catattccc tcaaagaata taaaaagaa caattaacg 40

<210> 49
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 49
tatgttcatg cgatggcgca ccagctgggc g 31

<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 50
gccatcagca ggcttagcgc 20

<210> 51
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造

200909585

<220>
<223> PCR 引子
<400> 51
gggtattgtg gcatgtttaa ccg 23

<210> 52
<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子
<400> 52
agacattaaa aatatacgtg cagctaccg 30

<210> 53
<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子
<400> 53
gtgaaagctg acaacccttt tgatctttta 30

<210> 54
<211> 22
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子
<400> 54
ggctcattgc accacatcc ag 22

<210> 55
<211> 24
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子
<400> 55
gaaaagacgc gctgacaata cgcc 24

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子
<400> 56
gcatgggtaa acttaaggcg 20

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

200909585

<400> 57
taatcaccaa cgtatcgggc 20

<210> 58
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 58
cgcggttgg tcgggtaacg g 21

<210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 59
tcgggtatt taaccgtag tgcc 24

<210> 60
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 60
ggcaattacc ctgacgtac cgg 23

<210> 61
<211> 25
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 61
ccgatggatg atctgttaga ggcgg 25

<210> 62
<211> 22
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 62
gcgtaacctt ttccctggaa cg 22

<210> 63
<211> 24
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 63
gcgttgctgg agcaacctgc cagc 24

200909585

<210> 64
<211> 65
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 64
ccttttattc actaacaat agctggtgga atatatgtcc aacaatggct cgtcaccgct 60
ggtgc 65

<210> 65
<211> 43
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 65
aatcgcaagc ttgaatccgg ttatttcttc agttcagcca ggc 43

<210> 66
<211> 65
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 66
gcaccagcgg tgacgagcca ttgttgaca tatattccac cagctatttg ttagtgaata 60
aaagg 65

<210> 67
<211> 33
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 67
acgtcccggg caagcccaaa ggaagagta ggc 33

五、中文發明摘要：

一種用於從碳源製造 1,2-丙二醇的微生物，其中該微生物的特徵為：

- 改善從二羥丙酮磷酸鹽至 1,2-丙二醇之生合成途徑的活性；以及
- 減弱 3-磷酸甘油醛去氫酶的活性。

本發明亦係關於一種藉由根據本發明之微生物的發酵製造 1,2-丙二醇的方法。

六、英文發明摘要：

Microorganism useful for the production of 1,2-propanediol from a carbon source, wherein said microorganism is characterized by:

- an improved activity of the biosynthesis pathway from dihydroxyacetone phosphate to 1,2-propanediol, and
- an attenuated activity of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase;

The invention is also related to a method for producing 1,2-propanediol by fermentation with a microorganism according to the invention.

十、申請專利範圍：

1. 一種用於從碳源製造 1,2-丙二醇的微生物，其中該微生物的特徵為：
 - 改善從二羥丙酮磷酸鹽至 1,2-丙二醇之生合成途徑的活性；以及
 - 減弱 3-磷酸甘油醛去氫酶的活性。
2. 如申請專利範圍第 1 項之微生物，其係經基因性地改良以增加與從二羥丙酮磷酸鹽至 1,2-丙二醇生合成途徑有關的至少一種酵素之活性。
3. 如申請專利範圍第 2 項之微生物，其中藉由增加編碼該酵素之基因的表現可增加該至少一種酵素的活性。
4. 如申請專利範圍第 3 項之微生物，其中選自由 *mgsA*、*yafB*、*yeaE*、*yghZ*、*yqhE*、*yqhD*、*ydhF*、*yedW*、*yajO*、*ydjG*、*ydbC*、*tas*、*gldA* 和 *fucO* 構成之群組的至少一種基因表現被增加。
5. 如申請專利範圍第 4 項之微生物，其中 *mgsA*、*yqhD* 和 *gldA* 三種基因的表現被增加。
6. 如申請專利範圍第 1~5 項中任一項之微生物，其中該至少一種酵素的活性與減弱恩特納-杜多羅夫途徑有關。
7. 如申請專利範圍第 6 項之微生物，其中下列至少一種基因的表現被減弱：*edd*、*eda*。
8. 如申請專利範圍第 1~7 項中任一項之微生物，其

中至少一種與甲基乙二醛轉化成乳酸鹽有關之酵素的活性被減弱。

9. 如申請專利範圍第 8 項之微生物，其中下列至少一種基因的表現被減弱：*gloA*、*aldA*、*aldB*。

5 10. 如申請專利範圍第 1~9 項之微生物，其中至少一種與乳酸鹽、甲酸鹽或乙醇的合成有關之酵素的活性被減弱。

11. 如申請專利範圍第 10 項之微生物，其中下列至少一種基因的表現被減弱：*ldhA*、*pflA*、*pflB*、*adhE*。

10 12. 如申請專利範圍第 1~11 項中任一項之微生物，其中至少一種與醋酸鹽的合成有關之酵素的活性被減弱。

13. 如申請專利範圍第 12 項之微生物，其中下列至少一種基因的表現被減弱：*ackA*、*pta*、*poxB*。

15 14. 如申請專利範圍第 1~13 項之微生物，其中糖吸收效率被增加。

15. 如申請專利範圍第 14 項之微生物，其中係利用與磷酸烯醇丙酮酸鹽無關的糖吸收系統。

16. 如申請專利範圍第 15 項之微生物，其中選自 *galP* 和 *glk* 中的至少一種基因之表現被增加。

20 17. 如申請專利範圍第 14 項之微生物，其中藉由增加代謝物“磷酸烯醇丙酮酸鹽”的可利用率提高糖-磷酸轉移酶系統的效率。

18. 如申請專利範圍第 17 項之微生物，其中至少一種

酵素丙酮酸鹽激酶的活性被減弱。

19. 如申請專利範圍第 18 項之微生物，其中選自 *pykA* 和 *pykF* 中的至少一種基因之表現被減弱。
20. 如申請專利範圍第 17~19 項中任一項之微生物，其中該磷酸烯醇丙酮酸鹽合成酶的活性被減弱。
21. 如申請專利範圍第 20 項之微生物，其中 *ppsA* 基因的表現被增加。
22. 如申請專利範圍第 1~21 項中任一項之微生物，其中該有利於代謝丙酮酸鹽成乙醯基輔酶 A 的酵素對 NADH 的抑制作用較未改良酵素具有較低敏感性。
23. 如申請專利範圍第 22 項之微生物，其中該 *lpd* 基因具有導致以纈胺酸取代丙胺酸 55 的點突變。
24. 如申請專利範圍第 1~23 項中任一項之微生物，其中選自 *arcA* 和 *ndh* 中的至少一種基因之表現被減弱。
25. 如申請專利範圍第 1~24 項中任一項之微生物，其中該微生物係選自由細菌、酵母和真菌構成之群組。
26. 如申請專利範圍第 25 項之微生物，其中該微生物係選自由腸桿菌科、芽孢桿菌科、梭狀桿菌科、鏈黴菌科和棒狀桿菌科所構成的群組。
27. 如申請專利範圍第 26 項之微生物，其中該微生物係大腸桿菌或丙酮丁醇梭菌。

28. 一種製造 1,2-丙二醇的方法，其中如申請專利範圍第 1~27 項中任一項之微生物係生長於含有碳源的一適當生長培養基內，以及收集其所產生的 1,2-丙二醇。
- 5 29. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該微生物係大腸桿菌以及該碳源係一種單糖碳源。
30. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該微生物係丙酮丁醇梭菌以及該碳源係一種複合糖碳源。
- 10 31. 如申請專利範圍第 28~30 項中任一項之方法，其中該收獲的 1,2-丙二醇被進一步純化。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

5

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

15

20